

Inmunoterapia del cáncer 2002

I. Melero, M. Bendandi

*Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y Área de Terapia Celular de la Clínica Universitaria.
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra*

Correspondencia

Maurizio Bendandi o Ignacio Melero

Área de Terapia Celular. Clínica Universitaria

Avda. Pío XII, 36

31008 Pamplona

(mbendandi@unav.es)

(imelero@unav.es)

Hace tan sólo una década que se decía "el cáncer había hecho mucho más por la inmunología que la inmunología por el cáncer". Con ello se quería menospreciar la inmunoterapia, al considerarla como un campo de investigación biomédica en el que se habían invertido grandes cantidades de dinero, sin obtener beneficios terapéuticos prácticos. Hoy en día el panorama ha cambiado y hasta los máximos detractores reconocen tanto el progresivo impacto de la inmunoterapia en el tratamiento de varias neoplasias, como la gran actividad desarrollada en ensayos clínicos en todo el mundo. El progreso se ha centrado fundamentalmente en seis puntos que vamos a considerar sucintamente. Estos campos de desarrollo destacado a nuestro juicio son:

1. Identificación de antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T y su utilización tanto para la formulación de vacunas terapéuticas, como para la monitorización de la respuesta inmunitaria.
2. Desarrollo de anticuerpos monoclonales con actividad anticancerosa ejercida a través de diferentes mecanismos.
3. Optimización de las técnicas de terapia celular adoptiva transfiriendo linfocitos activados con especificidad antitumoral.
4. Identificación y utilización de citoquinas con capacidad antitumoral, bien administrándolas como proteínas recombinantes, o bien en estrategias de terapia génica.
5. Vacunación terapéutica basada en la utilización de células dendríticas.
6. Transplante alogénico de precursores hematopoyéticos no mieloablativo, mediante el que se obtiene un efecto antitumoral mediado por los linfocitos injertados del donante, que reconocen aloantígenos en las células malignas.

Cada una de estas áreas de investigación concentra enorme interés y es difícil predecir cuál o cuáles (muy probablemente en combinación), conseguirán vencer en el reto de lograr eficacia reproducible frente a enfermedades malignas. Las razones para el optimismo son sólidas, sobre todo si se ponen en

contraposición con la situación global del campo hace sólo cinco años. La intención de este editorial es exponer de modo sencillo el estado de la cuestión en estos avances y remitir al lector a un número limitado de referencias, fundamentalmente revisiones recientes^{1,2}, donde localizar información más detallada y las fuentes originales.

Identificación de antígenos tumorales

El trabajo de T. Boon y otros pioneros a principio de los 90, permitió identificar químicamente los primeros determinantes antigénicos que eran presentados por células tumorales, primero de ratón y luego humanas. En primer lugar se identificaron secuencias peptídicas expresadas selectiva o exclusivamente por las células malignas que eran reconocidas por linfocitos T citotóxicos y más adelante también secuencias reconocidas por linfocitos T cooperadores³. Estos descubrimientos, que probaban definitivamente la antigenicidad de los tumores sólidos, se realizaron a través de dos aproximaciones experimentales: (i) el aislamiento y secuenciación de genes que codificaban para el antígeno basándose en que cuando eran transfectados a células autólogas transferían la capacidad de activar a los linfocitos T específicos y (ii) la elución, purificación y secuenciación de los péptidos presentados en la superficie de las células tumorales por las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Anteriormente se habían identificado antígenos tumorales en dos situaciones especiales: aquellas en que los tumores están transformados por secuencias virales y, aquellas neoplasias derivadas de linfocitos B (leucemias, linfomas y mielomas) que presentan determinantes antigénicos específicos fruto del reordenamiento somático de los genes de las inmunoglobulinas, inherente y exclusivo de cada clon de linfocitos B maduros (determinantes idiotípicos). En particular, dos estudios sobre la vacunación idiotípica para el tratamiento de linfomas han permitido demostrar por primera vez que: i) es posible vacunar a un paciente contra un antígeno de su propio tumor⁴ y ii) que dicha vacunación puede tener eficacia clínica⁵.

Un hecho importante, que debemos afirmar claramente, es que la totalidad de los tumores tiene secuencias proteicas propias fruto de las mutaciones que han dado lugar a la transformación neoplásica. Además, muchos casos reexpresan de modo ectópico o sobreexpresan proteínas que son reconocibles por los mecanismos efectores del sistema inmunitario, aunque curiosamente no parecen despertar una respuesta inmunitaria. En el argot inmunológico, describimos esta situación diciendo que los tumores son antigénicos pero no son, o son per se, muy poco inmunogénicos.

Por tanto, gran parte del éxito en el desarrollo de la vacunación terapéutica con secuencias peptídicas antigénicas se centra en el uso de estrategias adyuvantes, que aumenten artificialmente la inmunogenicidad. De hecho, en ausencia de efecto adyuvante, la administración de péptidos antigénicos (sobretodo por vía intravenosa) tiende a inducir un estado de falta de capacidad de respuesta frente a ese antígeno específico, que llamamos tolerancia inmunológica.

Destacamos por su aplicabilidad clínica la conjugación química de las proteínas antigénicas tumorales con proteínas de invertebrados, la formulación en micropartículas o sustancias hidrófobas, y la coadministración con sustancias proinflamatorias que activan al sistema inmunitario innato, atrayendo y activando a células profesionales presentadoras de antígeno. La identificación de las células dendríticas como las principales mediadoras de la presentación antigénica así como el parcial esclarecimiento de su fisiología, han permitido utilizar estas células aisladas y cultivadas como los adyuvantes de mayor potencia conocidos.

Cuando hablamos de pacientes con cáncer hablamos de vacunación terapéutica, por contraposición a vacunación profiláctica⁶, debido a que el paciente vacunado padece ya la enfermedad cuando es inmunizado. Esta situación ha suscitado un dilema sobre si en el momento de iniciar el tratamiento, el sistema inmunitario del paciente sea ya totalmente tolerante a los antígenos tumorales. Esto puede ser verdad en algunos casos, pero la experimentación con modelos murinos y las observaciones en pacientes indican que entre el sistema inmunitario y los antígenos tumorales parece existir una relación de ignorancia, o indiferencia, en la que coexisten pacíficamente células antigénicas y los elementos capaces de destruirlas. No hay inmunización ni tolerancia, por tanto es posible la vacunación terapéutica⁷.

En el caso de que las secuencias antigénicas sean compartidas por el tejido maligno y algún tejido normal del organismo existe el riesgo de autoinmunidad. Si la respuesta es intensa, estas reacciones adversas pueden darse, como ejemplifica el vitíligo que acompaña al tratamiento inmunoterápico de pacientes que sufren melanoma. En el futuro próximo, a medida que seamos capaces de inducir y sostener respuestas antitumorales más potentes, veremos casos de autoinmunidad que tendremos que aprender a controlar clínicamente^{8,9}.

La mutación artificial, para optimizar el efecto de algunos de estos antígenos utilizados como péptidos sintéticos, está proporcionando buenos resultados y es un campo prometedor. Se busca mejorar su afinidad por las moléculas que les presentan o por receptores de antígeno de linfocitos T.

Las técnicas habituales utilizan péptidos sintetizados en el laboratorio o proteínas purificadas que son producidas mediante microorganismos recombinantes. Estas técnicas son factibles con

secuencias antigénicas comunes en tumores de ciertas estirpes pero son difíciles de llevar a la práctica con mutaciones específicas de cada tumor individual. Este hecho es una limitación importante, ya que estos antígenos específicos de cada tumor es probable que sean capaces de producir respuestas inmunitarias de mayor beneficio terapéutico. *A priori* el mejor antígeno tumoral es aquel que las células malignas no pueden perder para escapar a la respuesta inmunitaria, debido a que es el producto de una mutación necesaria para mantener el fenotipo neoplásico, colocando a la célula maligna "entre la espada y la pared". Existe una excepción que facilita la producción de grandes cantidades de antígeno tumoral específico, como es la purificación de la inmunoglobulina idiopática de linfomas y mielomas. En este caso se recurre, entre otros métodos, a producir hibridomas secretores fusionando células linfomatosas del paciente con líneas de mielomas no secretores o se realiza directamente a partir de la paraproteína presente en el suero del enfermo, mediante técnicas cromatográficas¹⁰.

Desarrollo de anticuerpos monoclonales con actividad anticancerosa

En 1975, el recientemente fallecido Cesar Milstein en colaboración con el también desaparecido George Köhler, desarrollaron un método para inmortalizar clones de células B productoras de anticuerpo con especificidad conocida, fusionando esplenocitos de ratones inmunizados con líneas de mielomas murinos. Estos anticuerpos monoclonales han revolucionado todos los campos de la biomedicina al permitir la detección, purificación y cuantificación de múltiples proteínas. Desde su descubrimiento, se pensó que tendrían una aplicación inmediata en el tratamiento de tumores malignos al vehiculizar a las células neoplásicas mecanismos naturales de destrucción celular dependientes de anticuerpo o artificiales como radioisótopos o toxinas¹¹. Para su aplicación terapéutica en humanos, es necesario humanizar lo más posible la secuencia de los anticuerpos monoclonales producidos en roedores para evitar la inmunización del paciente frente a las secuencias murinas del anticuerpo monoclonal. Las primeras humanizaciones, se conseguían sustituyendo por ingeniería genética aquellas regiones de las cadenas de inmunoglobulina de ratón por secuencias homólogas de inmunoglobulinas humanas, respetando las secuencias que estaban implicadas en interaccionar con el antígeno. Como evidente mejora de estos procedimientos, se han obtenido ratones modificados genéticamente en los que se han silenciado los genes de las inmunoglobulinas de ratón y se les ha hecho transgénicos para los *loci* de las inmunoglobulinas humanas. Estos ratones al ser inmunizados producen anticuerpos humanos, de modo que en un primer paso se pueden obtener anticuerpos monoclonales totalmente humanizados utilizando técnicas de fusión celular convencionales.

Una limitación, que ha requerido técnicas ingeniosas de fabricación y puesta en marcha de biorreactores, es la necesidad de producir cantidades grandes de anticuerpo necesarias para sustentar la investigación clínica y su eventual comercialización.

Los principales éxitos clínicos hasta ahora se han obtenido con anticuerpos dirigidos frente a proteínas de membrana de linfocitos para tratar linfomas, así como con anticuerpos capaces de bloquear la unión de factores de crecimiento o supervivencia del tumor a sus receptores sobre la superficie de la célula.

la maligna¹². Cabe destacar, por formar ya parte del arsenal terapéutico común, a los anticuerpos anti CD20 utilizados frente a diferentes tipos de linfoma, los anticuerpos anti Her-2/neu utilizados en cánceres de mama y ovario, así como aquellos anti receptor del factor de crecimiento epitelial (anti-EGFR). Estos anticuerpos consiguen sus efectos promoviendo la destrucción de células tumorales o alterando la señalización de factores tróficos. Aunque poseen eficacia por si mismos, la investigación clínica se orienta a probar su efecto en combinación con terapias convencionales de quimioterapia y radioterapia con las que en general parecen mejorar de modo importante sus efectos. Existe una cantidad sustanciosa de agentes de este tipo en fase de ensayos clínicos con fundamentos parecidos. Algunos de esos anticuerpos actúan bloqueando los fenómenos de vascularización tumoral, al inhibir el efecto de los factores que liberan las células malignas o el estroma para promover la formación de vasos.

Existe otro grupo de anticuerpos monoclonales en desarrollo temprano que actúan como estimuladores de la respuesta inmunitaria celular frente al tumor. Parece que actúan sobre proteínas de membrana de linfocitos T, u otras células del sistema inmunitario, proporcionando señales activadoras o bloqueando la función de receptores inhibidores o de frenado. Cabe destacar a los anticuerpos anti CD152 (CTLA-4), anti CD137 (4-1BB) y anti CD40^{13,14}. Sus potentes efectos terapéuticos en modelos de ratón han determinado el comienzo de su desarrollo transicional preclínico/clínico.

No conviene dejar de mencionar el efecto de anticuerpos capaces de eliminar o modular la función de linfocitos T reguladores. Esas subpoblaciones linfocitarias están especializadas en inhibir o limitar la expansión de linfocitos T potencialmente efectores que no han tenido reconocimiento antigénico previo. La eliminación de estas poblaciones con anticuerpos anti-CD25 sinergiza en modelos de ratón con otros tratamientos inmunoterapéuticos. Otros anticuerpos como anti-GITR puede que consigan efectos similares, o superiores, y es muy posible que sean probados clínicamente en un futuro próximo¹⁵.

Optimización de las técnicas de terapia celular adoptiva con linfocitos activados

La infusión de linfocitos activados con citoquinas (células LAK) o linfocitos infiltrantes de tumores activados en cultivo (TILs) tuvieron una singular aceptación para el tratamiento del melanoma en la década de los 80s, a raíz de unas series de pacientes publicadas por el grupo de S. Rosenberg. La no reproducibilidad de la eficacia en series más largas y controladas de pacientes nos condujo a una situación de franco escepticismo sobre estos procedimientos terapéuticos.

Durante los últimos cinco años, los trabajos de P. Greenberg y S. Riddell¹⁶ analizando y optimizando la producción masiva de linfocitos a partir de clones de células T, han permitido emprender un desarrollo clínico mucho más fiable. Al menos en algunos casos de melanoma refractario a otros tratamientos consiguen eficacia clínica y demuestran la migración de los linfocitos con capacidad tumoricida al tejido tumoral. Cabe decir que, los primeros éxitos de esta técnica no los obtuvieron en pacientes neoplásicos, sino para prevenir la neumonía por citomegalovirus común en los pacientes inmunosuprimidos que son sometidos a

un trasplante alogénico de médula ósea. Para ello utilizaron clones de linfocitos T citotóxicos con capacidad de responder frente a este virus. En este sentido, se ha documentado también la eficacia de la terapia celular adoptiva con linfocitos específicos antivirales en neoplasias inducidas o relacionadas con la infección por virus de Epstein Barr. La implantación a gran escala de estas técnicas choca, hoy por hoy, con los elevados costes debidos a la laboriosidad y duración de los procedimientos de cultivo, clonaje por dilución límite, selección y expansión masiva.

En donde la infusión de linfocitos T con fines terapéuticos se ha convertido en rutina clínica eficaz, es en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En estos pacientes el resultado de la infusión de linfocitos T del donante es con frecuencia la remisión de la leucemia recidivante. Hoy sabemos que el mecanismo de acción es resultado del llamado "efecto injerto frente a leucemia", íntimamente relacionado con la patogenia de la enfermedad injerto contra huésped, por reconocimiento de antígenos menores de histocompatibilidad, sobre las células malignas en el primer caso y sobre células normales de diferentes órganos en el segundo. Hay líneas de investigación que buscan disociar la enfermedad injerto contra huésped del efecto antitumoral mediado por linfocitos T y/o NK.

En nuestra opinión estos métodos de inmunoterapia adoptiva tendrán su aplicación práctica asociados a estrategias de inmunoterapia activa (vacunación), que faciliten la expansión primero *in vivo* y luego *in vitro* de los linfocitos T con especificidad antitumoral¹⁷.

Identificación y utilización de citoquinas con capacidad antitumoral administrando proteínas recombinantes o mediante técnicas de terapia génica

Desde el descubrimiento de las primeras citoquinas, estos polipéptidos solubles, que regulan la función de diferentes estirpes de leucocitos y la respuesta inflamatoria, han sido objeto de investigación en terapia del cáncer. El Interferón-alfa es tratamiento electivo en la terapia del melanoma y de algunos tipos de leucemia. La Interleuquina-2 ha demostrado cierta eficacia en el tratamiento del melanoma y del hipernefroma. Algunas citoquinas sobre las que inicialmente se depositó gran esperanza como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el interferon-gamma son excesivamente tóxicas para ser administrados por vía sistémica. Estas citoquinas sólo se utilizan en clínica para perfundir una extremidad aislada portadora de tumor y existe gran interés experimental en la transferencia de los genes que las codifican al tejido maligno, permitiendo un efecto terapéutico confinado localmente con bajas concentraciones sistémicas. La terapia génica permite, utilizando diferentes vectores cada día más sofisticados, transferir al tejido maligno genes que codifican para estas citoquinas. Como indicábamos, se busca que el efecto antitumoral ocurra exclusivamente en el tejido patológico y en los órganos y tejidos linfoides a los que éste drena. Cabe esperar, en un futuro próximo, una gran mejoría en obtener mayores niveles de expresión que sean, además, regulables farmacológicamente.

El agente antitumoral de este tipo con mayor potencia preclínica es la interleuquina-12 (IL-12)¹⁸. A pesar de que en el desarrollo clínico temprano de la molécula se registraran acon-

tecimientos adversos letales que pararon durante años el ulterior desarrollo, éste ha sido retomado recientemente. La transferencia génica de esta citoquina tiene también prometedoros efectos sobre tumores de roedores. Se han aislado sustancias de estructura y función parecida a la IL-12 (IL-23 e IL-27), cuyos efectos antitumorales se están empezando a explorar.

Existen resultados que permiten afirmar que el GM-CSF (factor de crecimiento de colonias granulo-monocíticas) se indicará frecuentemente como tratamiento adyuvante en diferentes neoplasias y como potenciador de procedimientos de inmunización terapéutica, debido a sus efectos atrayentes y diferenciadores *in situ* de células dendríticas.

Además de las mencionadas, una familia de citoquinas comienza su desarrollo clínico, de entre las que destaca Flt-3L con interesantísimos efectos antitumorales directos por activación de células NK y sobretodo por su capacidad de multiplicar enormemente el número de células dendríticas disponibles para su aislamiento y manipulación¹⁹.

Existen otras citoquinas producidas por el tumor cuya función parece que es rentable interferir, puesto que regulan a la baja la intensidad de la respuesta inmunitaria. Este es el caso del TGF-beta. Se están desarrollando estrategias preclínicas basadas en estas ideas con buenos resultados en tumores de ratón²⁰.

Los efectos generales que constituyen el objetivo de la terapia con citoquinas son:

1. Activar la respuesta inmunitaria celular preexistente o inducida mediante una maniobra de vacunación.
2. Incrementar el infiltrado leucocitario en el tumor induciendo una respuesta inflamatoria.
3. Bloquear la formación de neovasos (angiogénesis y vasculogénesis) en el tejido maligno.
4. Inducir muerte celular programada (apoptosis) en las células tumorales.

Vacunación terapéutica con células dendríticas

Todavía no han transcurrido siete años desde que se demostró que las células dendríticas que presentaban antígenos tumorales podían prevenir y tratar el crecimiento de tumores implantados en ratones²¹. Fisiológicamente, las células dendríticas son las protagonistas de la presentación antigénica que activa la respuesta efectora de linfocitos T. Lo pueden hacer porque expresan la dotación apropiada de moléculas presentadoras, las citoquinas más adecuadas y los importantes ligandos moleculares que actúan estimulando diferentes receptores de membrana de los linfocitos T.

Este sistema celular de vigilancia se despliega en tejidos periféricos y desde allí tiene la capacidad de captar y transportar los antígenos a los tejidos linfoides.

Desde hace algunos años es posible diferenciar *in vitro* estos leucocitos a partir de sus precursores mieloides o a partir de monocitos en presencia de un cocktail de citoquinas que incluye GM-CSF^{22,23}. La sencillez de estos procedimientos ha permitido poner en marcha una multitud de ensayos clínicos en los que las células dendríticas, cultivadas o purificadas a partir de la sangre periférica del paciente, son expuestas a una fuente de antígenos tumorales definida o compleja para formular una vacuna. Fuentes definidas son determinados antígenos peptídicos

(péptidos sintéticos o proteína purificada) o el gen que codifica para el mismo y que puede ser transfectado a las células dendríticas. Fuentes complejas son aquellas como lisados tumorales, células tumorales irradiadas, fusiones célula tumoral/célula dendrítica para formar células híbridas o RNA total del tumor: es decir, aquellas que tienen en su composición múltiples antígenos tumorales, la mayoría no identificados. Una alternativa a la carga artificial de antígeno consiste en inyectar las células dendríticas en las lesiones tumorales, dejando que ellas capten aquellos antígenos que tengan a su alcance para migrar luego a tejidos linfoides²⁴.

En la actualidad existen más de cien ensayos clínicos en todo el mundo que tratan de establecer: (i) la más eficaz ruta de administración, (ii) el mejor origen de las células dendríticas (monocitos, precursores mieloides o células movilizadas con flt-3L), y (iii) la mejor fuente de antígeno²⁵.

Hay resultados muy prometedores en varias aproximaciones, consiguiéndose frecuentemente respuestas clínicas y biológicas en los pacientes. Este tipo de tratamientos tiene visos de implantarse como práctica clínica habitual en el manejo de pacientes oncológicos y es muy posible que encuentre mayor eficacia en el tratamiento de pacientes con escasa carga tumoral y cuando se utiliza en combinación con otras estrategias terapéuticas.

Transplante de progenitores hematopoyéticos no mieloablativo en pacientes con tumores sólidos

En una serie de pacientes con adenocarcinoma renal en estadio avanzado y con hermano HLA idéntico disponible se ha demostrado que el transplante alogénico de progenitores hematopoyéticos consigue efectos curativos en algunos casos, por efecto de los linfocitos T del donante con capacidad de destruir selectivamente células del tumor. Lo peligroso es que el efecto terapéutico va ligado a la aparición de episodios de enfermedad injerto contra huésped agudo, que pueden ser letales²⁶.

Como hemos mencionado más arriba, en los últimos años se intenta disociar la actividad del injerto frente a tumor de la que ejerce sobre el huésped. Estas estrategias, en esencia intentan reinfundir al paciente sólo aquellas células que reconocen antígeno en el tumor pero no en el resto de los tejidos, eliminando aquellos linfocitos que se activan *in vitro* en respuesta a células presentadoras del receptor. También mediante la introducción en los linfocitos de genes de susceptibilidad a fármacos (genes suicidas), de modo que los linfocitos pueden ser eliminados caso de aparecer los efectos indeseados. Las células NK, en su capacidad de reconocer aloantígenos (o mejor dicho, en su capacidad de detectar la ausencia de antígenos propios), es muy probable que también sean explotables en este ámbito.

Consideraciones finales

Predecir el futuro de un campo tan fértil es difícil. Nuestra opinión personal es que la combinación de varias estrategias terapéuticas con efectos no sólo aditivos sino sinérgicos encontrará mayor y más reproducible eficacia clínica. Es muy probable que los mayores beneficios para los pacientes se encuentren al combinar varios métodos de inmunoterapia con estrategias terapéuticas convencionales (cirugía, radioterapia y quimioterapia).

Es previsible un enorme progreso y estandarización en nuestra capacidad de medir la respuesta inmunitaria frente a los tumores²⁷, de forma que podamos comparar y correlacionar fiablemente estos datos con los efectos clínicos y que podamos e inferir o predecir dichos efectos.

Como en cualquier otra aproximación terapéutica al cáncer, a medida que nuestros tratamientos sean más efectivos, encontraremos mecanismos de escape y resistencia al tratamiento cuya identidad y fundamento molecular habrá que establecer. Entre ellos: pérdidas de antígenos, pérdidas de moléculas presentadoras o inducción de moléculas con capacidad inmunosupresora local o sistémica.

También, a medida que aumentamos la potencia de las respuestas inducidas, o transferidas, veremos reacciones autoinmunes más severas cuyos riesgos y manejo clínico deberemos aprender. No obstante, los datos que afloran en los ensayos clínicos hablan de una ventana terapéutica aceptable, aunque está aún por ver que ocurrirá al tratar tumores que comparten antígenos con tejidos vitales sin capacidad de regeneración.

Queda, por tanto, una gran cantidad de investigación clínica apasionante por hacer. Esto requiere estructuras ágiles y bien financiadas, que puedan absorber ensayos clínicos bien diseñados para seguir avanzando de acuerdo a los cánones de la "medicina basada en la evidencia", además de equipos multidisciplinarios capaces de llevar a buen término estos proyectos. Con ello el futuro de estos tratamientos parece ciertamente prometedor.

Agradecimientos

Agradecemos a los doctores Prieto, Rocha, Mazzolini, Rodríguez-Calvillo, Inogés y Feijoo su apoyo y comentarios críticos.

Bibliografía

- Melief CJ, RE Toes, R. Offringa. Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv Immunol* 2000;75:235.
- Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:227.
- Boon T, Van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725.
- Kwak LW, Campbell MJ, Levy R. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med* 1992;327:1209.
- Bendandi M, Gocke CD, Kwak LW, *et al.* Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999;5:1171.
- Forni G, Lollini PL, Musiani P, Colombo MP. Immunoprevention of cancer: is the time ripe? *Cancer Res* 2000;60:2571.
- Chen L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. *Immunol Today* 1999;19:27.
- Overwijk WW, Restifo NP. Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Crit Rev Immunol* 2000;20:433.
- Tirapu I, Mazzolini G, Melero I, *et al.* Effective tumor immunotherapy: start the engine, release the brakes, step on the gas pedal,...and get ready to face autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2002;50:13.
- Bendandi M. Role of anti-idiotypic vaccines in the modern treatment of human follicular lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001;1:65.
- Milstein C, Waldmann H. Optimism after much pessimism: what next? *Curr Opin Immunol* 1999;1:589.
- Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2000;26:269.
- Allison J. Immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2002;14:631.
- Melero I, Shuford WW, Chen L, *et al.* Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997;3:682.
- Sutmoller RP, Van Duivenvoorde LM, Melief CJ, *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001;194:823.
- Riddell SR, Warren EH, Reenberg MG, *et al.* Immunotherapy of human viral and malignant diseases with genetically modified T-cell clones. *Cancer J* 6 Suppl 2000;3:S250.
- Mazzolini G, Qian C, Narvaiza I, Barajas M, Borrás-Cuesta F, Xie X, Duarte M, Melero I, Prieto J. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther* 2000;11: 113.
- Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. *Trends Immunol* 2001;22:113.
- Lynch DH, Andreasen A, Schuh JC. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* 1997;3:625.
- Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001;7:1118.
- Mayordomo JI, Zorina T, Deleo AB, *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995; 1:1297.
- Banchereau J, Pulendran F, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767.
- Guermonprez P, Valladeau J, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621.
- Melero I, Vile RG, Colombo MP. Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte? *Gene Ther* 2000; 7:1167.
- Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;50:507.
- Dansey RD, Baynes RD. Nonablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 2001;13:27.
- Yee C, Greenberg P. Modulating T-cell immunity to tumours: new strategies for monitoring T-cell responses. *Nat Rev Cancer* 2002;2:409.